

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間： 2008～2009
 課題番号： 20760535
 研究課題名(和文) 多孔質担体充填マイクロツールを利用した単一細胞からの遺伝子発現解析法の開発

研究課題名(英文) Development of Gene Expression Analysis Technique from Single-Cells by Using Micro-Tools Filled with Porous Carrier

研究代表者

新垣 篤史 (ARAKAKI ATSUSHI)
 東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・助教
 研究者番号： 10367154

研究成果の概要(和文): 本研究では、標的とする単一細胞から微量なmRNAを効率的に回収し、遺伝子発現解析を可能とする系の構築を目的とした。基板上に細胞をアレイ化し標的細胞を分取するマイクロツールや、網羅的なmRNA抽出を可能とする多孔質担体充填マイクロツールを製作し、全血中の単一免疫細胞からのレセプター遺伝子や抗体遺伝子の発現解析およびシーケンス解析に利用し、本技術の単一細胞解析における有効性を示した。

研究成果の概要(英文): In the aim of gene expression analysis from single-cells, micro-tools enabling accurate separation of target single-cells and high efficient mRNA extraction methods were developed. Gene expression and sequence analyses from single immune cells were achieved by the methods using the micro-tools. The developed cell analysis techniques have further potential as a valuable and widely applicable for studies on gene screening and expression analyses of various kinds of cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野： 工学

科研費の分科・細目： プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード： 単一細胞解析、遺伝子発現解析、マイクロツール、mRNA回収

1. 研究開始当初の背景

細胞の分化・誘導やがん化におけるシグナル伝達機構など、単一細胞解析技術は将来の医療革命を支える基盤技術となり得ることから、その大きな市場を目指して近年急速に研究開発が展開されている。単一細胞の解析

においては、フローサイトメーターを用いた手法が最も一般的に利用されてきたが、これは細胞の形態的特徴や抗体染色による蛍光強度から細胞を分取するものであり、得られる情報の種類が限定されている。また、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション

は、顕微鏡観察下で組織切片から細胞を切除する技術であり、これにより得られた細胞からの遺伝子抽出が行われているが、フローサイトメーター同様に簡便性に欠ける。これに対して、マイクロ流体デバイスを用いた単一細胞解析法は、連続的な送液による細胞の分離や溶液の添加が可能であり、簡便化やハイスループット化が行える。また、顕微鏡との組み合わせにより、単一細胞における抗原やタンパク質の動態的な局在性解析と遺伝子発現解析を行うことが可能である。さらに、バルブ付チャンネルを備えた高度に流体を制御した系によって、微量な細胞からの遺伝子抽出を可能とする手法が開発されている。しかしながら、多くは流路構造が複雑であるため、単一細胞の網羅的な解析に対応した系は存在しなかった。単一細胞からのmRNAの抽出やPCRに対応するキット類の市販製品も存在するが、発現量が少ないターゲットについては十分に対応できていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、標的とする単一細胞から微量なmRNAを効率的に回収し、遺伝子発現解析を可能とする系の構築を目的とした。基板上に細胞をアレイ化し標的細胞を分取するマイクロツール、および網羅的なmRNA抽出を可能とする多孔質担体充填マイクロツールを作製する。さらにこれらを用いて、全血中の単一免疫細胞からのレセプター遺伝子や抗体遺伝子の発現解析およびシーケンス解析に応用し、本技術の単一細胞解析における有効性を実証する。

3. 研究の方法

(1)細胞の培養、染色

細胞は、ヒト急性リンパ芽球性白血病患者由来T細胞(Jurkat細胞)もしくはヒトバークットリンパ腫由来B細胞(Raji細胞)を用いた。サイトメガロウイルス(CMV)特異的TCR遺伝子の解析には、健常者血液由来の細胞を使用した。細胞の染色には、PE標識-抗CD8抗体(Becton Dickinson社)、Hoechst 33342(Molecular Probes社)、PE標識-MHCクラスタンパク-CMV抗原ペプチドpp65複合体テトラマー(MBL社)を用いた。

(2)モノリスシリカ充填マイクロ孔基板の作製

規則的な微細孔を有する基板の孔内にモノリスシリカ合成溶液を満たし、ミネラルオイル中に浸漬した状態で静置後、加熱処理することで、モノリスシリカ充填マイクロ孔基板を作製した。さらに、モノリスシリカ充填孔内にアミノ基修飾した後、Oligo(dT)を固定化した。

(3)細胞アレイデバイスとマイクロマニピュレーターを用いた単一細胞の分取

基板上に規則的な微細孔を有する細胞アレイを組み込んだマイクロ流体デバイスを作製し、多数の単一細胞の同時配列化に利用した。顕微鏡観察下で、細胞表面マーカーを指標として標的とする細胞の探索を行った。目的とする単一細胞は、マイクロマニピュレーターシステムを用いて分取し、続く遺伝子発現解析に使用した。

(4)RNA抽出、cDNA化、PCR、real-time PCR mRNAの抽出には、 μ MACS mRNA Isolation Kit (Miltenyi)およびPicopure RNA Isolation Kit (MDS Analytical Technologies Inc)を用いた。cDNA化には、PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kitを用いた。PCRにはTaq polymeraseを使用した。Real-time PCRは、SYBER Premix Ex Taq II (TaKaRa BIO社)を用いて反応液を調製し、Thermal Cycler Dice Real Time System (TaKaRa BIO社)を用いて解析を行った。

(5)TCR 遺伝子のクローニングとシーケンス解析

cDNA化したTCR- 遺伝子の増幅はnested PCRにより行った。プライマーのデザインおよび反応条件は、Zhouらの報告に従って行った(Zhou D. et al. 2006)。得られた増幅産物は、ABI Prism 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems社)を用いてシーケンス解析を行った。

4. 研究成果

(1)単一細胞からのmRNA抽出の検討

はじめに単一細胞からのmRNA抽出法の比較検討を行った。市販製品の μ MACS mRNA Isolation Kit、Picopure RNA Isolation Kitを用いてRNAを抽出し、cDNA化した産物に含まれるGAPDHを指標としたreal-time PCRにより定量解析した。得られたcDNAをテンプレートとしてreal-time PCRを行い、単一細胞中に含まれるGAPDHのコピー数を定量し、比較したところ、picopure RNA Isolation Kitの方が効率よく単一細胞からRNAを抽出できることが示された。さらに、キット等を用いた抽出操作を経ずに、細胞溶解物をダイレクトにcDNA化に使用する手法も同様に検討を行った。その結果、単一細胞当りのGAPDHのコピー数は約1800と算出され、本法によって最も効率よくmRNAをcDNA化できることが示された。このことは、RNAの抽出操作を行わずに、細胞内のmRNAを直接reverse transcription反応に使用したことで、抽出操作におけるRNAのロスが少なくなったためと考えられた。よって、以降の検討では、より煩雑な操作を含まない系を用いたRNA抽出

法を選択することにした。

(2)モノリスシリカ充填マイクロ孔基板を用いた単一細胞からの遺伝子抽出、増幅法の開発

遺伝子発現解析への利用を目的とし、アレイ状の貫通孔にpoly(dT)固定化モノリスシリカを形成した基板を作製した。細胞懸濁液を基板上に滴下することにより、一細胞を各貫通孔内に捕捉することが可能であった。さらに、基板上に捉えた細胞を溶解させ、細胞内容物をpoly(dT)固定化モノリスシリカと反応させることで、mRNAをモノリスシリカに吸着させて回収することが可能であることが示された。また、モノリスシリカの充填された孔内において逆転写反応、PCRによるターゲット遺伝子の増幅を行うOneStep reverse transcription-PCRを用いる遺伝子解析法についても検討を行った。反応条件を検討することで、基板上に捉えた細胞に対してOneStep reverse transcription-PCRを行うことにより、特異的遺伝子を増幅することが可能であった。

(3)細胞アレイデバイスとマイクロマニピュレーターを用いた単一細胞からの遺伝子発現解析

多数の単一細胞を規則的に配列可能な細胞アレイを備えたマイクロ流体デバイスを作製し、細胞表面マーカーを指標として標的細胞を検出した。標的細胞は、顕微鏡に設置したマイクロマニピュレーターシステムを用いて分取し、遺伝子発現解析を行った。はじめに、血清供給または血清飢餓条件にて培養を行った細胞間における β -actin mRNA発現量の変動を単一細胞レベルで定量評価することとした。 β -actinをコードする遺伝子は血清応答遺伝子として知られており、血清供給に伴い発現が誘導される(Femino et al. 1998, Levsky et al. 2002)。血清供給条件および血清飢餓条件で培養したJurkat細胞におけるGAPDHおよび β -actin mRNAの発現量を単一細胞レベルで比較したところ、血清供給条件にて培養したJurkat細胞のGAPDHおよび β -actin遺伝子の平均発現量はそれぞれ約1600 copies/cell、約2000 copies/cellと算出された。また、血清飢餓条件において培養したJurkat細胞においてはGAPDH遺伝子、 β -actin遺伝子の平均発現量はそれぞれ約1700コピー、約700コピーと算出された。ここで算出された値はFeminoらの報告と近似しており、このことから、本手法によって単一細胞の発現量を定量的に評価できることが示唆された。さらに、血清供給細胞と血清飢餓細胞ではGAPDH遺伝子の発現量に大きな違いは見られなかったが、一方で、 β -actin遺伝子においては発現量に差異が見られた。

このことは、血清飢餓により細胞増殖が抑制され、細胞周期がG₀期に同調される (Zhou et al. 2005) ということによるものと考えられた。

一方で、この解析の実施の中で、細胞のサイズに多様性が認められた(Fig. 1A)。そこで、予め顕微鏡イメージから細胞サイズを計測した後、個々の細胞を分取し、mRNA発現量の細胞サイズ依存性を評価した。その結果、20 μ m以下のサイズのJurkat細胞は、GAPDH、 β -actin mRNAの発現量が低い細胞(2000 copies/cell以下)の割合が大きいのにに対し、20 μ m以上のサイズの細胞では両遺伝子の発現量が高い細胞(2000 copies/cell以上)の割合が大きい傾向が見られた(Fig. 2B, C)。このことから、GAPDH、 β -actin mRNAの発現量は細胞サイズに依存する可能性も考えられた。

以上の検討結果より、本手法を用いて単一細胞レベルでの遺伝子発現解析を実施することが可能であることが示された。

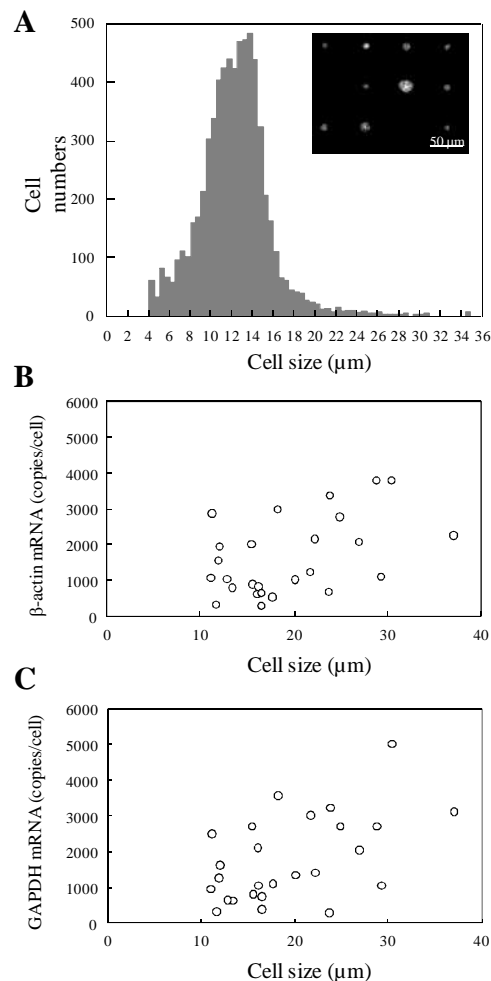


Fig. 1 Jurkat T細胞のサイズ分布 (A)、Jurkat T細胞のサイズと β -actin (B)およびGAPDH (C) mRNAの発現レベルとの相関。

(4) 単一細胞からのヒトTCR遺伝子レパトア解析

単一細胞由来のTCR遺伝子の抽出と増幅

T細胞の機能や免疫応答の更なる解明にむけて、単一細胞レベルでのTCRのレパトア解析の重要性が挙げられ、近年では、TCR V のサブファミリーに対応した抗体が開発され、抗体を用いた解析が行われてきている。しかし、抗体を用いた解析では解析対象となる領域がV のみと限定されることから、遺伝子レベルでのより詳細なTCRのレパトア解析が望まれる。そこで、ここではTCRのV からC 領域を網羅する配列情報の獲得を目的として、PCRを利用したTCRのレパトア解析を行うこととした。単一細胞より得たmRNAに対してV およびC 領域から設計されたプライマーを用いてreverse transcription-PCRすることで、単一細胞レベルでのTCRのレパトア解析を行った。

ヒトT細胞株であるJurkat細胞に対して、TCR- 特異的プライマー mixtureを用いてreverse transcription-PCRを行った結果、検討を行ったすべてにおいて300 bp付近にバンドが見られた。この時、 5×10^6 cells相当のJurkat細胞より調製したサンプルにおいても同じ位置にバンドが確認されたことから、単一Jurkat細胞に由来するTCR遺伝子の発現を検出することができたと考えられた。さらに、その後のシーケンス解析の結果において、単一細胞から得られた配列と 5×10^6 cells相当の細胞から得られた配列が一致したことから、これらの細胞集団は同一レパトアのレセプターを保持していることが示唆された。以上の結果から、単一T細胞からRNAを抽出し、TCRの同定までを行えることが示唆された。

単一細胞からのサイトメガロウイルス(CMV)特異的TCR遺伝子の解析

単一細胞レベルでのCMV特異的CD8⁺T細胞のTCRのレパトア解析を行うにあたり、細胞アレイ上でCMV特異的CD8⁺T細胞の検出が可能であることを確認した。PE標識-pp65テトラマーおよびHoechst 33342を反応させたCD8⁺T細胞を細胞アレイ上に捕捉し、蛍光顕微鏡により観察したところPEおよびHoechstによって染色された細胞を確認することができた。このことから細胞アレイ上でのCMV特異的CD8⁺T細胞の検出が可能であることが確認された (Fig. 2A, B)。

次に、細胞集団から、CMV 特異的 CD8⁺T 細胞および非特異的 CD8⁺T 細胞をそれぞれマイクロマニピュレーターを用いて分取し、reverse transcription-PCRによりTCR- 遺伝子の発現を確認したところ、それぞれのサンプルにおいて 300 bp 付近にバンドが確認された (Fig. 2C)。これらの増幅産物のシー

ケンス解析を行った結果、各細胞のTCR- のレパトアを同定することが可能であり、CMV 特異的 T 細胞で同定されたレパトアは過去の報告と一致した (Trautmann L. et al. 2005)。以上より、本手法によって CMV 特異的 CD8⁺T 細胞が検出され、さらにその TCR のレパトア解析を単一細胞レベルで行えることが示された。本解析技術は、がん抗原特異的細胞からの TCR レパトア解析等にも利用可能であると考えられ、他の細胞解析技術への応用が期待される。

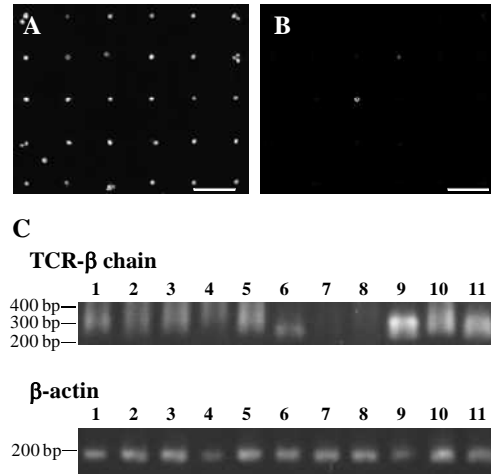


Fig. 2 CMV特異的CD8⁺ 単一T細胞からのTCR-β遺伝子の解析。基板上にアレイ化した細胞の蛍光顕微鏡像 (Scale bar = 60 μm), Hoechst 33342染色(A) およびCMV pp65 tetramer染色(B)。単一細胞から得られたTCR-βとβ-actin遺伝子の増幅産物の電気泳動写真(C)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

Arakaki A, Ooya K, Akiyama Y, Hosokawa M, Komiyama M, Iizuka A, Yamaguchi K, Matsunaga T. TCR-Beta Repertoire Analysis of Antigen-Specific Single T-Cells Using a High-Density Microcavity Array. *Biotechnol Bioeng*, 106: 311-318, 2010. (査読有)

Hosokawa M, Arakaki A, Takahashi M, Mori T, Takeyama H, Matsunaga T. High-Density Microcavity Array for Cell Detection: Single-Cell Analysis of Hematopoietic Stem Cells in Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Anal Chem*, 81: 5308-5313, 2009. (査読有)

Matsunaga T, Hosokawa M, Arakaki A, Taguchi T, Mori T, Takeyama H. High-Efficiency Single-Cell Entrapment and Fluorescence in Situ Hybridization Analysis Using a Poly(dimethylsiloxane) Microfluidic Device Integrated with a

Black Poly(ethylene terephthalate) Micromesh. Anal Chem, 80: 5139-5145, 2008.
(査読有)

〔学会発表〕(計3件)

細川正人、早田大志、福田頼謙、新垣篤史、吉野知子、松永 是、「全血からの循環腫瘍細胞高効率検出デバイスの開発」第90春季年会 日本化学会、2010年3月29日、近畿大学(大阪府)

細川 正人、新垣 篤史、竹山 春子、松永 是、「高密度単一細胞アレイを用いた希少細胞検出技術の開発」化学センサ研究会、2009年9月10日、東京農工大学小金井キャンパス(東京都)

細川正人、新垣篤史、大森啓太郎、田中あかね、松田浩珍、田中 剛、松永 是、「高密度単一細胞アレイを用いた希少細胞検出技術の開発」(春)電気化学会第76回大会、2009年3月31日、京都大学吉田キャンパス(京都府)

〔図書〕(計1件)

秋山靖人、新垣篤史(分担)「シングルセル解析の最前線」第4章 10-1細胞分離技術を用いたがん特異的免疫細胞の遺伝子スクリーニング法の開発、シーエムシー出版、pp. 274-282, 2010.

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：サイズ選択のマイクロキャピティアレイを用いた循環腫瘍細胞の検出

発明者：松永是、新垣篤史、細川正人

権利者：国立大学法人 東京農工大学

種類：特願

番号：2010-024774

出願年月日：2010年2月5日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tuat.ac.jp/matunaga/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新垣 篤史 (ARAKAKI ATSUSHI)

東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・助教

研究者番号： 10367154

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし